Dal **Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale**
Vol. IX, fasc. 6, 1934

OSSERVAZIONI SULLA CROMATINA DELLE CELLULE COLTIVATE *IN VITRO*. Del prof. G. VERCELLANA.

Dato che, in confronto alle ricerche fatte sulla struttura fondamentale del citoplasma delle cellule coltivate *in vitro*, sono relativamente poco numerose le osservazioni sull'intima struttura del nucleo nelle stesse condizioni sperimentali, mi è parso utile ed interessante studiare se è rilevabile qualche differenza fra i costituenti nucleari di tali cellule e di quelle normali dei tessuti, collo scopo anche di affrontare il problema già affacciato nel 1917-18 da G. Levi (1) sulla genesi dei cromosomi dalla sostanza apparentemente omogenea del nucleo in riposo. Inoltre, ho voluto saggiare l'azione della temperatura e l'azione di alcuni agenti chimici sulla morfologia della cromatina e l'azione della temperatura sulla grandezza cellulare e nucleare.

Mi sono valso di cuore, pelle, muscoli e connettivo degli arti, prelevati da embrioni di pollo tra il 5° e l'8° giorno di incubazione e da embrioni di cavia lunghi da 10 a 35 mm circa.

Ho allestito culture in goccia pendente secondo il metodo di Carrel, su vetro o su mica, mescolando in parti uguali plasma di pollo ed estratto embrionale di pollo. Con materiale di cavia solo pochi esperimenti furono fatti in plasma ed estratto embrionale omologhi, avendo per lo più usato plasma ed estratto embrionale di pollo.

Dopo 24-48-72 ore di permanenza a 37°C., le culture venivano esaminate a luce trasmessa ed in singoli casi in campo oscuro e poi, stante la difficoltà dell'esame a fresco del nucleo, fissate e colorate rispettivamente coi metodi di Biondi-Heidenhain (ritenuto elettivo per la cromatina) e di Feulgen (elettivo per l'acido timonucleinico).

Per studiare l'azione della temperatura sul nucleo, le varie culture, trascorsi i suddetti periodi di tempo, erano suddivise in tre serie: una serviva da controllo (37°C.), un'altra era posta in frigorifero a +5°C. e l'ultima in una stufa da paraffina a 43°-47°C. Il tempo di sog-

(1) *Arch. Ital. di Anat. e di Embriol.*, 1917-18, **4**, 423.

giorno delle culture a +5°C. ed a 43°-47°C. oscillò fra 30' e 2 ore circa. Per constatare, poi, l'influenza della temperatura sulla grandezza cellulare e nucleare, culture di cuore embrionale di pollo al 7° giorno d'incubazione, tenute alla temperatura normale di 37°C., vennero confrontate con altre tenute rispettivamente a 16°-21°C. per 24 ore ed a 43°C. per 10 ore, fissate poi tutte contemporaneamente e colorate col metodo di Biondi-Heidenhain. Numerose cellule di queste culture *in vitro,* scelte a caso fra le più periferiche e lamellari di ogni singolo espianto, e, per il confronto, cellule di sezioni microtomiche di cuore embrionale di pollo al 7° giorno d'incubazione e non coltivato, furono disegnate su carta millimetrata, mediante l'uso della camera lucida, ad un ingrandimento di 1000 diametri e dai disegni ho letto direttamente in mmq l'area delle cellule e dei rispettivi nuclei, valori corrispondenti in μ^2 alle aree reali delle cellule. Essendo praticamente impossibile valutare il volume del citoplasma e del nucleo, mi sono limitato, nel paragone fra le cellule del tessuto non coltivato e le cellule coltivate *in vitro,* a considerare *il rapporto di superficie nucleo-plasmatico* e per le cellule coltivate *in vitro* ho calcolato anche l'*indice nucleo-plasmatico* col criterio adottato da Levi (2) e Dogliotti (3), secondo la formula:

$$\text{indice nucleo-plasmatico} = \frac{\text{area nucleare} \times 100}{\text{area cellulare} - \text{area nucleare}}$$

Ecco, in breve, i risultati ottenuti in seguito alle succitate ricerche.

Nei tessuti coltivati *in vitro,* tanto di pollo, quanto di cavia, la cromatina dei nuclei in riposo non risulta aumentata rispetto a quella dei corrispondenti tessuti normali, ad onta del costante elevato potere proliferativo mantenuto da queste cellule.

Nei nuclei in riposo di embrione di pollo, col metodo di Biondi-Heidenhain i nucleoli sono costantemente colorati in rosso (*nucleoli plastinici*), mentre il resto del contenuto nucleare presenta una tinta verde debolissima, spesso appena apprezzabile, e si nota qualche raro granulo di ossicromatina. Col metodo di Feulgen si rileva che i nuclei sono colorati diffusamente in violetto piuttosto pallido; la tinta però non è perfettamente omogenea, ma come distribuita a piccole nubecole indistinte; inoltre vi è qualche piccolo granulo più intensamente colorato. Nell'embrione di cavia si nota costantemente una maggior quantità di

(2) *Arch. Ital. di Anat. e di Embriol.,* 1906, 5, 291.

(3) *Arch. für exper. Zellforsch.,* 1926, 3, 242.

piccole zolle e granuli di basicromatina, mescolati a granuli di ossicromatina, tanto nei nuclei del tessuto normale, quanto in quelli delle cellule coltivate *in vitro*.

Durante il processo mitotico la basicromatina, colorabile col verde di metile secondo il metodo di Biondi-Heidenhain, è tutta concentrata nei cromosomi: nel pollo essa sembra aumentata di molto rispetto a quella diffusa a tutto il nucleo in riposo, mentre nella cavia si ha come l'impressione di una agglutinazione, di un concentramento dei granuli e delle zollette di basicromatina prima sparsi nel nucleo.

Le differenze riscontrate fra l'embrione di pollo e quello di cavia nella distribuzione e nella quantità della cromatina sia dei nuclei in riposo, sia di quelli in mitosi, sono differenze di specie già note da tempo. È però di un certo interesse rilevare come queste differenze persistano nelle condizioni di cultura *in vitro*, dato morfologico questo che è perfettamente in accordo col dato fisiologico, dimostrato fra l'altro da A. Fischer (4), della persistenza nelle culture *in vitro* della specificità di specie.

L'acido timonucleinico, invece, dimostrato col metodo di Feulgen, sembra quantitativamente uguale nel nucleo in riposo ed in quello in mitosi degli embrioni di pollo e di cavia.

Le basse temperature (+5°C.) non modificano sensibilmente i caratteri morfologici nè del nucleo in riposo, nè della parte cromatica della mitosi, mentre le alte temperature (43°-47°C.) determinano una distribuzione irregolare della cromatina dentro i nuclei in riposo ed una conglutinazione dei cromosomi durante la cariocinesi, conglutinazione già osservata all'esame a fresco dal Bucciante (5).

L'azione prolungata delle temperature inferiori alla normale produce un rimpicciolimento dell'area di proiezione del nucleo e non modifica molto l'espansione del citoplasma, mentre l'azione di temperature superiori alla norma determina un aumento dell'area di proiezione tanto nucleare che citoplasmatica.

Infine, ho osservato, in modo chiarissimo, la comparsa e la conservazione del fuso acromatico, dei centrioli e delle radiazioni intorno a questi nelle cellule in mitosi delle culture *in vitro* trattate coll'acido nucleinico secondo Hefe (Schuchardt) o coll'acido orto-fosforico (Erba) e poi colorate col metodo di Biondi-Heidenhain; meno evidentemente

---

(4) München, Mueller u. Steinichke, 1930.

(5) *Arch. für exper. Zellforsch.*, 1927, 5.

in quelle sottoposte all'azione di altri acidi, come l'acido formico o l'acido acetico. Resta da decidere se è in giuoco un'azione biologica della cellula viva, oppure, più semplicemente, una particolare azione fissatrice delle menzionate sostanze.

(Con presentazione di figure e di grafici).

(Dagli Istituti di Istol. e Fisiol. generale della R. Univ. di Bologna; di Patologia generale e Batteriologia della R. Università di Parma).

Sezione di Bologna. - Seduta del 18 aprile 1934.